*Cryptogamie, Mycol.*, 1989, 10 (2): 141-164 

# PHYSIOLOGIE ET BIOCHIMIE DU DEUTÉROMYCÈTE *TRICHOTHECIUM ROSEUM* (PERS.) LINK EX GRAY: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Liliane GOETSCH, Florence LEMOYNE et Noël ARPIN

Laboratoire de Mycochimie (Unité associée au CNRS, 1127)
Institut de Chimie et de Biologie cellulaire et moléculaire,
Université Claude-Bernard, 69622 Villeurbanne Cedex

RÉSUMÉ - Le Deutéromycète *Trichothecium roseum*, espèce très largement répandue, a fait l'objet de recherches approfondies notamment au point de vue biochimique. Une revue bibliographique analytique est proposée, centrée essentiellement sur la nature et les propriétés des métabolites secondaires synthétisés par cette espèce. *T. roseum* se révèle être remarquable par sa capacité de synthèse:
- de terpénoïdes, notamment de sesquiterpénoïdes, avec les époxy-12,13 trichothécènes, classe de mycotoxines redoutables, et de diterpénoïdes à squelette de type rosane,
- de roseotoxine B, mycotoxine à structure peptidique lactone cyclique,
- de mycosporine glutaminol,
- de très nombreuses enzymes, de nature essentiellement hydrolytique, dont l'activité a été étudiée en vue d'une utilisation dans le domaine agroalimentaire.

ABSTRACT - The Deuteromycete *Trichothecium roseum*, species with a worldwide distribution, has been submitted to thorough research especially in the biochemical field. Principally focused on the nature and properties of secondary metabolites of this species, an analytical review is proposed. *Trichothecium roseum* is remarkable for his capacity to synthesize:
- terpenoids, especially sesquiterpenoids - with the 12,13 epoxytrichothecenes, extremely hazardous mycotoxins - and diterpenoids with rosan skeleton,
- roseotoxin B, mycotoxin with a cyclic lactone peptidic structure,
- mycosporine glutaminol,
- and very numerous enzymes, essentially hydrolytic, whose activity have been studied in order to be used in the (agro) alimentary field.

MOTS CLÉS : *Trichothecium roseum*, physiologie, biochimie, revue bibliographique.

## INTRODUCTION

*Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Gray, Deutéromycète de la famille des Moniliacées, forme des colonies roses, à croissance rapide: 6cm de diamètre sur

extrait de Malt, à 25°C, en 7 jours. Leur surface est pulvérulente du fait de la présence d'innombrables conidies (Domsch & al., 1980; Samson & al., 1981), multinucléées, ellipsoïdes à pyriformes, 12-23 (-35) x 8-10 (-13)$\mu$m, à paroi épaisse, presque lisse, à cicatrice basale oblique et contenant typiquement 2 cellules à maturité (non septées à l'état jeune). Ces conidies sont disposées en zig-zag sur des conidiophores dressés, non ramifiés, de 4-5$\mu$m de large et 2mm de hauteur, septés à leur base avec une paroi plus ou moins rugueuse (Domsch & al., 1980).

Cette espèce présente une distribution ubiquiste à la surface de la terre, consécutive à la dispersion aérienne des conidies; *T. roseum* affecte particulièrement les substrats végétaux pourrissant, envahissant des sporocarpes de macromycètes, des pommes, des graines et divers produits amylacés. Pour une analyse exhaustive des sources à partir desquelles *T. roseum* a été isolé, le lecteur est renvoyé au travail de compilation de Domsch & al. (1980).

## CONIDIOGENÈSE

La conidiogenèse, originale, de *T. roseum* a été successivement analysée par Ingold (1956), Nicot & Leduc (1957), Kendrick & Cole (1969), Cole & Samson (1979): ces auteurs ont observé que la formation des conidies s'effectue selon un processus rétrogressif avec succession basipète de conidies entrainant le raccourcissement de l'hyphe conidiogène.

Cole & Samson (1979) ont bien montré qu'à partir d'une hyphe, apparemment de même morphologie qu'une hyphe végétative, s'initie, à l'apex, une conidie primaire de type holoblastique. Par la suite, chaque conidie secondaire naît, d'une façon asymétrique, à la base et du côté opposé à celle qui la précède, par rupture de la paroi conidiogène, d'où la présence d'une collerette (mode entéroblastique). Une conidie libérée portera ainsi 2 cicatrices, l'une latérale correspondant au point de fixation de la conidie supérieure, l'autre terminale représentant le point d'attache sur l'axe conidiogène.

Les cultures de *T. roseum* présentent un polymorphisme sporal net, bien étudié par Montant en 1952: outre les macroconidies bicellulaires décrites ci-dessus, on observe dans des cultures plus âgées, ou maintenues en présence d'une forte humidité, des microconidies (36 x 1-3$\mu$m) uninucléées. Montant (1952) signale également la présence de chlamydospores et de quelques formes aberrantes.

Abondante dans les cultures de surface, la sporulation paraît beaucoup plus difficile à obtenir en milieu submergé. Vezina & al. (1965) ont néanmoins signalé l'obtention de $2.10^7$ spores/ml après 5 jours de culture dans un milieu contenant de la liqueur de maïs, de la molasse et du chlorure de sodium.

## BACTÉRIES ET VIRUS ASSOCIÉS AU *T. ROSEUM*; ACTIVITÉ ANTIVIRALE

L'observation la plus intrigante est relative à l'apparition d'un trouble, en milieu submergé, dû au développement d'une bactérie. Compte-tenu de l'existence

systématique de ce trouble dans des conditions rigoureuses d'aseptie (Lermiterie, 1973), force est d'admettre l'existence d'une association entre *T. roseum* et une bactérie qui se propage et croît en milieu agité (Sancholle & al., 1977). Selon les auteurs précités toutes les souches de *T. roseum* collectées *in natura* sur des substrats variés et celles provenant de diverses collections possèdent cette bactérie qu'il n'a pas été possible d'éliminer, même en pratiquant des cultures à partir d'une seule spore et en présence d'antibiotiques. Sancholle & al. (1977) indiquent qu'il s'agit d'une bactérie Gram$^+$ pouvant être reliée au groupe des Corynébactéries, localisée le long de la paroi hyphale avec laquelle elle se trouve liée par de nombreux tractus.

Enfin on a isolé d'une souche de *T. roseum* des particules virales hexagonales de 45 nm de diamètre ou $VLP_s$ (Virus Like Particles) contenant de l'ARN double brin (George & al., 1981).

Bawden & Freeman (1952) constatent que des extraits de *T. roseum* inhibent la prolifération de virus végétaux. Cette inhibition s'explique par la présence de trichothécine et d'un polysaccharide qui agissent différemment. La nature et l'ampleur de l'inhibition dépendent beaucoup plus de la plante hôte que du virus utilisé.

## PHYSIOLOGIE: INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE, DU PH ET DES SOURCES NUTRITIONNELLES

La température optimale de croissance de *T. roseum* se situe aux alentours de 25°C, avec des limites inférieure et supérieure de 15 et 35°C respectivement. En ce qui concerne le pH, le champignon se révèle très tolérant, supportant des écarts de 2 unités de part et d'autre du pH 6, valeur optimale fixée pour les milieux de culture avant inoculation (Hasija & Agarwal, 1978). Généralement, on observe une alcalinisation progressive au cours du développement des cultures pouvant atteindre des valeurs aussi élevées que 9,5 (Favre-Bonvin & al., 1987). Cependant, comme c'est le cas avec d'autres champignons, la nature des sources nutritives, notamment azotées, influe beaucoup sur l'évolution du pH. En effet une source d'azote ammoniacal entraine une forte acidification lorsque l'ion $NH_4^+$ est lié à l'anion d'un acide fort (Morgan & Macmillan, 1954). On peut noter à ce sujet que, contrairement à l'asparagine, la glutamine utilisée comme seule source d'azote, ne permet pas la croissance et la sporulation du *T. roseum* car elle entraine une trop forte acidité du milieu: 3,75 au 14ème jour de culture. En revanche, si le pH est maintenu à une valeur voisine de la neutralité, la glutamine s'avère alors un excellent aliment azoté autorisant croissance et sporulation du *T. roseum* (Favre-Bonvin & al., 1987). Une telle différence entre asparagine et glutamine s'observe également dans le cas du *Nectria galligena* étudié par Dehorter (1985). A notre connaissance la raison précise de l'acidification consécutive à la présence de glutamine - et non d'asparagine - demeure, à ce jour, inexpliquée.

Hasija & Agarwal (1978) ont testé la capacité de 2 isolats du *T. roseum* à utiliser différentes sources d'azote: N-nitrique, N-ammoniacal et N-organique provenant d'acides aminés. Le tartrate d'ammonium - qui ne provoque pas d'acidification -, les peptones, l'asparagine et les acides glutamique et aspartique

constituent les sources les plus efficaces pour la croissance et la sporulation. Simola & Lonnroth (1979) ont examiné le comportement du *T. roseum* en présence de diverses petites molécules aminées: une excellente croissance se produit avec la sérine, la proline, l'arginine (asparagine non testée) et l'acide γ-amino butyrique, fréquemment rencontré dans les plantes. L'homoarginine et la canavanine, homologues de l'arginine, synthétisées par les Légumineuses et toxiques vis-à-vis de nombreux microorganismes (non reconnues par les systèmes ARN-t synthétases) ne sont pas métabolisées par *T. roseum*. Ceci expliquerait selon Simola & Lonnroth (1979), la corrélation négative qui semble exister entre la présence de *T. roseum* sur les Légumineuses et leur contenu en canavanine.

Une étude similaire a été réalisée par ces auteurs avec divers sucres (pentoses, hexoses, di- et polyosides) alditols et acides du cycle de Krebs, comme sources carbonées; les meilleurs rendements de croissance et la meilleure sporulation ont été obtenus avec les D-glucose, D-fructose, D(+) Galactose, D(+) Mannose, le maltose et les dextrines. Favre-Bonvin & al. (1987) ont réalisé des cultures de *T. roseum* sur des milieux où le glucose est partiellement puis totalement substitué par de l'acide quinique (en ajustant le pH du milieu de culture initial à 6). Lorsque l'acide quinique constitue la seule source carbonée, mis à part l'asparagine, on observe un temps de latence de plusieurs jours, à l'issue duquel le champignon croît et sporule abondamment. Cette phase de latence correspond au délai nécessaire pour la synthèse des enzymes indispensables à l'utilisation de l'acide quinique, comme cela a été rapporté pour *Neurospora crassa* (Ahmed & Giles, 1969). Les modalités d'absorption du sorbose ont également été étudiées par Lermiterie (1973).

Montant & Orcival (1960) ont suivi la variation du rapport source carbonée/source azotée au cours de la croissance du *T. roseum*: l'augmentation de ce rapport, correspondant à une diminution de l'azote du milieu, a lieu au moment même où la vitesse de croissance est maximale, c'est-à-dire entre le 2ème et le 4ème jour de croissance, et traduit une synthèse active de protéines.

## BIOCHIMIE

Des analyses biochimiques relatives aux métabolites primaires de distribution très générale, comme les lipides membranaires, ont été réalisées sur le *T. roseum* (Montant & Sancholle, 1969; Zeleneva & al., 1979). Sancholle & Montant (1972) ont montré que la teneur en lipides totaux (acides gras saturés et insaturés, glycérides, phosphoglycérides et glycosphingolipides) comprise entre 10 et 20% du poids de mycélium sec, évolue en fonction de la teneur en glucose du milieu. Le rapport lipides libres/lipides liés augmente parallèlement à la teneur en glucose du milieu de culture.

Cependant les analyses les plus nombreuses ont eu pour objet des métabolites aux propriétés biologiques originales, abondamment synthétisés ou propres à cette espèce: terpénoïdes, roséotoxines et mycosporines, ainsi que les enzymes sécrétées dans le milieu de culture.

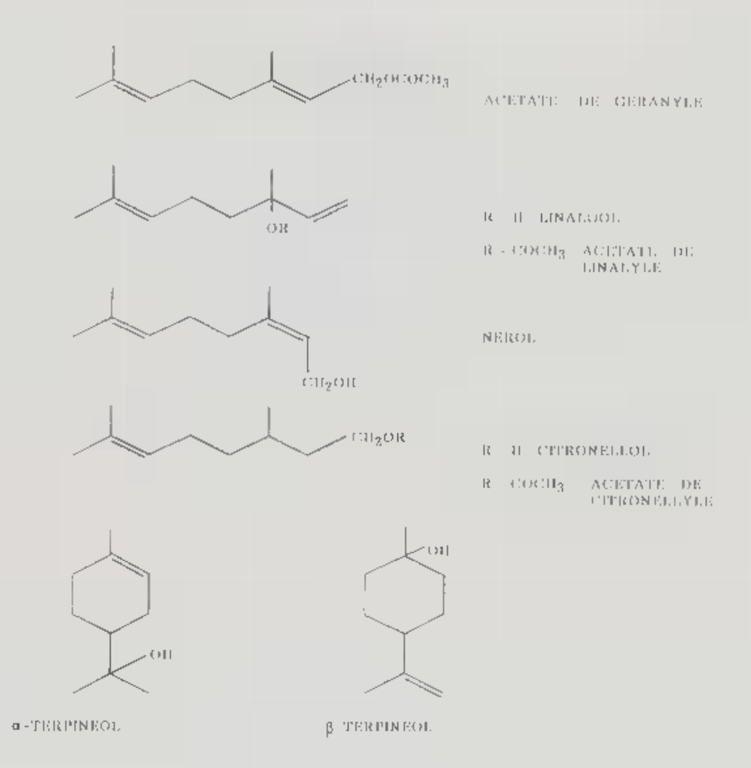



Figure 1: Les monoterpénoïdes de *Trichothecium roseum*.
Figure 1: monoterpenoids of *Trichothecium roseum*.

## Les terpénoïdes

- **Monoterpénoïdes** (Fig. 1): c'est à l'occasion d'une analyse conduite par Vanhaelen & al. (1978) pour reconnaître la nature des composés volatils émis par *T. roseum*, espèce connue pour attirer la mite du fromage, *Tyrophagus putrescentiae*, que l'on a découvert que ce champignon émet un bouquet odorant très complexe comprenant outre des substances caractéristiques de l'odeur du champignon (octène -1 ol- 3 et octadiène - 1,5 ol- 3), divers monoterpènes parmi lesquels sont identifiés le géranylacétate, le linalool, le linalylacétate, le citronellol, le citronellylacétate, l'$\alpha$ et $\beta$ terpinéol et le nérol.

- **Sesquiterpénoïdes** (Fig. 2): les plus simples des sesquiterpénoïdes isolés de *T. roseum* sont le nérolidol (Vanhaelen & al., 1978), le cyclonérodiol (Nozoe & al., 1970), le trichodiène et le trichodiol (Nozoe & Machida, 1970a,b). Les sesquiterpènes les plus étudiés sont les époxy - 12, 13 trichothécènes dont il est question ci-dessous.

1) La trichothécine: les propriétés antagonistes de *T. roseum* vis-à-vis d'autres champignons sont connus depuis le début de ce siècle grâce aux travaux de divers auteurs (Whetzel, 1909; Boning, 1933; Koch, 1934; Greaney & Machacek,

NEROLIDOL

CYCLONERODIOL

TRICHODIOL

TRICHODIENE

R = OCOCH=CHCH$_3$ TRICHOTHECINE

R = OH TRICHOTHECOLONE

R = OCOCH$_3$ ACETYLTRICHOTHECOLONE

CROTOCINE

Figure 2: Les sesquiterpénoïdes de *Trichothecium roseum*
Figure 2: Sesquiterpenoids of *Trichothecium roseum*.

1935) cités *in* Freeman & Morrison (1948, 1949a,b). En 1947, Brian & Hemming démontrent que c'est dans les filtrats de culture de *T. roseum* que se situent les principes responsables de l'activité antifongique vis-à-vis de plusieurs espèces de champignons. Ces observations justifient l'effort important consenti à cette époque par Freeman & Morrison pour découvrir la nature des molécules responsables des inhibitions de croissance rencontrées. Leurs travaux, réalisés dans

la perspective de disposer d'une substance antifongique efficace dans la lutte contre les parasites végétaux, ont abouti à l'isolement et à la caractérisation de la trichothécine, ester isocrotonique de la trichothécolone (Freeman & Morrison, 1948, 1949a,b; Freeman & al., 1949; Freeman, 1955; Freeman & al., 1959). La trichothécine est le principal époxy- 12, 13 trichothécène produit par *T. roseum*. Ce métabolite secondaire peut être aisément extrait à l'aide de solvants organiques comme le chloroforme, l'acétate d'éthyle ou le tétrachlorure de carbone, formant biphase avec le milieu de culture (Freeman & Morrison, 1949a,b).

Les teneurs de l'ordre de 30 à 40mg/l initialement obtenues par Freeman & Morrison (1948, 1949a) ont pu être notablement améliorées, atteignant 100mg/l, par substitution du tartrate d'ammonium au nitrate de sodium et addition de liqueur de maïs (Freeman & Morrison, 1949b) puis 200mg/l ap rès ajout de sulfate de zinc (Freeman, 1955). Le maximum de production se situe entre le 20ème et le 30ème jour d'incubation pour une culture en surface et au bout de 90h pour une culture submergée à une température de 25°C (Freeman, 1955).

Bien que très lipophile, la trichothécine est légèrement soluble dans l'eau (400mg/l à 25°C) et les solutions de ce composé sont stables entre les pH 1 et 10. Les autres caractéristiques physicochimiques et spectrales sont trouvées dans les articles de Tamm & Tori (1984) et Ueno (1983).

Propriétés biologiques de la trichothécine: Freeman & Morrison (1949b) démontrent que si la trichothécine se révèle inactive envers des bactéries Gram$^+$ et Gram$^-$ *(Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli)* aux concentrations de 400mg/l, elle inhibe, par contre, la croissance de 27 espèces de champignons choisis parmi des Zygomycètes, Deutéromycètes et Ascomycètes, à des concentrations comprises entre 0,13 et 80mg/l. La croissance de *Penicillium digitatum*, espèce la plus sensible, s'avère encore totalement inhibée avec 0,64mg/l de toxine alors que celle de *T. roseum*, l'espèce productrice, n'est que partiellement inhibée à 80mg/l. Le groupe de Maksimova a réexaminé l'effet inhibiteur de la trichothécine sur la germination des conidies de *T. roseum* (Maksimova & Grushina, 1974; Maksimova & al., 1973b, 1982) et sur divers myceliums, y compris celui de l'espèce productrice. Il semble en fait que le *T. roseum* soit protégé par la présence d'une protéase, la tricholysine, qui hydrolyserait la liaison époxyde, provoquant une inactivation partielle de la trichothécine (Maksimova & al., 1975).

La trichothécine est l'ester naturel le plus actif de la trichothécolone. En effet, à partir de cette dernière, divers esters ont été synthétisés et leurs activités testées en suivant le taux de germination des conidies de *Penicillium digitatum*; exprimées en pourcentage par rapport à celle de la trichothécine (100%) on observe les activités suivantes: acétyltrichothécolone (81%), crotonyltrichothécolone (24%), butyryltrichothécolone (20%), acétyldihydrotrichothécolone (6%). Ces résultats montrent l'importance de l'ester sur l'activité biologique puisque la crotonyltrichothécolone n'exerce que le 1/4 de l'activité de la trichothécine (isocrotonyltrichothécolone), et que la trichothécolone ne montre que 1% de l'activité de la trichothécine. En comparant les activités de l'acétyltrichothécolone et de l'acétyldihydrotrichothécolone qui sont respectivement de 81% et de 5,8% par rapport à la trichothécine, il est possible d'observer la nette influence de la double liaison en 9-10 sur l'activité. Enfin l'ouverture du cycle époxyde supprime l'activité biologique (Freeman, 1955). En résumé, la présence d'une double liai-

son en 9,10 et surtout le cycle oxyrane - époxy-12,13 - sont les deux éléments structuraux caractéristiques responsables de l'activité de la trichothécine et des trichothécènes en général.

Cette activité a également été observée chez une levure pathogène de l'homme: *Candida albicans* et elle a permis la mise au point d'une méthode de dosage biologique de la trichothécine. Sorenson & al. (1975) ont en effet observé l'existence d'une relation linéaire entre l'inhibition de croissance et le logarithme de la concentration en trichothécine, dans une gamme allant de 50μg/ml à 2mg/ml. Cette activité n'a cependant pas été exploitée pour le traitement des candidoses du fait de la haute toxicité de cette molécule: des doses uniques de 250mg/kg injectées par voie intraveineuse à des souris et par voie sous-cutanée à des rats, entrainent la mort. Sévère diarrhée avec saignements, excessive micturition, paralysie des membres sont les symptômes observés chez les rats traités par voie sous-cutanée (Freeman, 1955). Chez tous les animaux, l'application de trichothécine sur la peau entraine l'apparition de rougeur et d'irritation; il s'agit là d'un effet commun à tous les trichothécènes (Ueno, 1983; Tamm & Tori, 1984). De nombreux travaux ont montré que la toxicité des époxy-12,13 trichothécènes s'explique par le fait que ce sont de puissants inhibiteurs de la synthèse protéique entravant le fonctionnement de la peptidyltransférase (Carrasco & al., 1973).

Enfin, la trichothécine semble exercer une activité morphogène: épaississement et ramification des hyphes de *Botrytis cinerea* (Barathova & al., 1969; Betina & Vankova, 1977), formation des conidies du *T. roseum* (Pal'mova & Maksimova, 1976).

2) Trichothécolone et acétate de trichothécolone: la libération de trichothécolone, partie alcoolique de la trichothécine suit celle de la trichothécine dans le milieu de culture de *T. roseum* où elle ne représente que *ca.* 10mg/l (Dockerill & al., 1978). La présence d'un hydroxyle libre augmente sensiblement l'hydrosolubilité de cette molécule qui atteint 1400mg/l.

L'un d'entre nous a procédé à un examen approfondi de l'activité biologique de cette molécule, beaucoup moins toxique que la trichothécine et qui possède des activités antitumorales (Goetsch & al., à paraître).

L'acétate de trichothécolone constitue également un métabolite secondaire mineur libéré dans le milieu de culture et une analyse pratiquée sur des fruits de *Pimpinella anisum* contaminés par *T. roseum* révèle l'existence, en plus des trois précédents trichothécènes, de cinnamoyl-4-0- trichothécolone (Ghosal & al., 1982).

3) Crotocine: ce trichothécène, également connu comme antibiotique doit son nom au fait qu'il a été isolé tout d'abord de *Cephalosporium crotocinigenum* (Glatz & al., 1966). Possédant comme la trichothécine un OH en 4 estérifié par l'acide isocrotonique, il en diffère par la présence d'un second cycle époxyde, en configuration $\beta$, au niveau des carbones 7-8 (Gyimesi & Melera, 1967). Produit en faible quantité dans le milieu de culture, 0,9mg/l (Achilladelis & Hanson, 1969), cet époxytrichothécène se révèle inactif contre les bactéries à la concentration de 500μg/ml, exerce une faible activité antifongique, et possède une $DL_{50}$ de 800mg/kg après administration par voie intrapéritonéale. Ses propriétés physicochimiques sont décrites dans l'article de Tamm & Tori (1984).

D'autres composés, à l'état de traces, ont été isolés au cours d'expériences ayant pour objet de préciser la biosynthèse des terpénoïdes: il s'agit du trichodiène (Nozoe & Machida, 1970b; Evans & Hanson, 1976), de l'époxy-12,13 trichothecène- 9 (squelette de base des époxytrichothécènes) et de son produit de dihydroxylation en 4 et 8 (Machida & Nozoe, 1972a).

- **Diterpénoïdes** (Fig. 3): au cours de leurs recherches sur la trichothécine, Freeman & al. (1949) isolent 3 nouveaux diterpénoïdes (les deux premiers à partir du mycélium, le troisième dans le milieu de culture) qu'ils nomment respectivement roséine I, roséine II et roséine III. La même année, Robertson & al. extraient les roséines I et II et les baptisent respectivement rosénonolactone et rosonolactone. Harris & al. (1958) élucident la structure de ces 2 composés et le second est rebaptisé rosololactone. L'analyse par diffraction aux rayons X a permis d'assurer les structures et la stéréochimie de ces composés (Scott & al., 1964a).

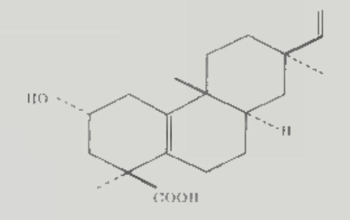
$R^1$ = H $R^2$ = O ROSENONOLACTONE

$R^1$ = OH $R^2$ = O HYDROXY-6 ROSENONOLACTONE

$R^1$ = H $R^2$ = $H_2$ DESOXY-7 ROSENONOLACTONE

$R^1$ = OH $R^2$ = $H_2$ ROSOLOLACTONE

$R^1$ = H $R^2$ = OH, H ROSENOLOLACTONE




ACIDE ISOROSENOLIQUE

Figure 3: Les diterpénoïdes de *Trichothecium roseum*.
Figure 3: Diterpenoids of *Trichothecium roseum*.

ACIDE MEVALONIQUE → UNITE ISOPRENE → + ($C_5$) → GERANYL PYROPHOSPHATE ($C_{10}$) → + ($C_5$) → FARNESYL PYROPHOSPHATE ($C_{15}$) → + ($C_5$) → GERANYL GERANYL PYROPHOSPHATE ($C_{20}$) → x2 → TETRATERPENOIDES (CAROTENOIDES)

FARNESYL PYROPHOSPHATE ($C_{15}$) → x2 → TRITERPENOIDES (STEROIDES)

$CH_2OPP$

FARNESYL PYROPHOSPHATE

CYCLISATION

TRICHODIENE

TRICHODIOL

12,13 EPOXYTRICHOTHECENE

TRICHODIECOLONE

TRICHOTHECINE

CYCLISATION

LABDANE

7-DESOXYROSENONOLACTONE

ROSENONOLACTONE

ROSOLOLACTONE

Figure 4: schéma de biosynthèse des sesqui- et diterpénoides. - Figure 4: biosynthesis of sesqui- and diterpenoids.

Par la suite d'autres diterpénoïdes sont isolés, en quantité restreinte: la rosénololactone (Achilladelis & Hanson, 1969), la désoxy-7 rosénonolactone (Whalley & al., 1959; Djerassi & al., 1966), l'hydroxy-6 rosénonolactone (Holzapfel & Steyn, 1968; Allison & al., 1968), l'acide isorosénolique (Scott & al., 1964b) et le pimaradiène-8,15 (Dockerill & Hanson, 1977).

- **Biosynthèse des sesqui- et diterpènes** (Fig. 4): du fait de sa capacité à produire des sesqui- et diterpènes, *T. roseum* a été beaucoup utilisé pour les études de biosynthèse des terpénoïdes. Il a été ainsi démontré que la formation de ces molécules en $C_{15}$ et $C_{20}$ résulte d'une conversion séquentielle du mévalonate: les dérivés pyrophosphorylés de l'isopenténylе et du diméthylallyle ($C_5$) s'associent pour former du géranylpyrophosphate ($C_{10}$), puis du farnésylpyrophosphate ($C_{15}$), enfin du géranylgéranylpyrophosphate ($C_{20}$).

Ainsi Evans & al. (1976b) réussissent l'incorporation de (2 -$^3H_2$; 2-$^{14}C$) - ((4R)-4-$^3H$; 2-$^{14}C$) et (5 -$^3H_2$; 2-$^{14}C$) mévalonate dans le pyrophosphate de farnésyle et le cyclonérodiol. Par contre le nérodiol n'est pas incorporé dans ces métabolites. De même Jones & Lowe (1960) démontrent que l'on obtient de la trichothécine marquée au - $^{14}C$ après administration de 1-$^{14}C$ acétate ou de 2-$^{14}C$ mévalonate. Trois molécules de mévalonate sont incorporées dans la partie trichothécolone de la trichothécine. Les mêmes précurseurs radioactifs permettent le marquage de la rosénonolactone (Birch & al., 1959; Britt & Arigoni, 1958).

Achilladelis & Hanson (1968) caractérisent l'incorporation des pyrophosphates de géraniol, farnésol et du labdane dans les métabolites de *T. roseum*. Le 1-$^{14}C$ géranylpyrophosphate est incorporé dans la rosénonolactone, la rosololactone et la trichothécine avec des rendements de 0,19, 0,17 et 1,51%. Ces expériences conduites en 1968 constituent la première démonstration de l'intervention du farnésolpyrophosphate dans la biosynthèse des sesqui- et diterpènes. Le 1-$^3H$ géranylgéraniol est lui aussi incorporé dans la rosénonolactone (Achilladelis & Hanson, 1968).

Au niveau des époxytrichothécènes, le trichodiène, métabolite issu de la cyclisation du farnésylpyrophosphate, isolé par Nozoe & Machida (1970b) constitue le précurseur de l'époxy-12,13 trichothécène; ce dernier s'hydroxyle en 8 et en 4 et après oxydation se transforme en trichothécolone. L'étude biosynthétique de la trichothécine à partir du 1,2- $^{14}C_2$ acétate a été également réalisée (Dockerill & al., 1978).

Au niveau des diterpènes il a été montré par marquage radioactif que la désoxy-7 rosénonolactone est le précurseur de la rosénonolactone (Achilladelis & Hanson, 1969) résultat confirmé par Holzapfel & al. (1969): *T. roseum* oxyde la désoxyrosénonolactone radioactive en rosénonolactone et rosololactone.

Pour une analyse plus approfondie des recherches biosynthétiques concernant notamment les mécanismes stéréochimiques, le lecteur est renvoyé aux travaux originaux référencés dans "Fungal metabolites II" (Turner & Aldridge, 1983; p. 228-238 pour les époxytrichothécènes et p. 276-277 pour le squelette rosane).

ROSEOTOXINE B

R = $CONH_2$ MYCOSPORINE GLUTAMINOL

R = COOH MYCOSPORINE GLUTAMICOL

Figure 5: Molécules azotées de *Trichothecium poseum* dérivées d'acides aminés.
Figure 5: Nitrogen compounds of *Trichothecium roseum* derivated from amino acids.

## Roséotoxine B

Richard & al. (1969, 1970) ont montré que les époxy-12,13 trichothécènes et les diterpènes n'étaient pas seuls responsables de la toxicité des extraits éthérés de *T. roseum*. A partir d'une souche MC-156, particulièrement toxinogène, cultivée sur riz, ils ont isolé une fraction TR-1 contenant une toxine ne provoquant pas de nécrose, comme l'aurait fait un époxytrichothécène. Cette toxine administrée par voie péritonéale, à la dose de 166mg kg provoque la mort de toutes les souris testées. Cette molécule soluble dans les solvants organiques, y compris l'éther et le chloroforme, contient une quantité non négligeable d'azote.

Engstrom & al. (1975) puis Engstrom (1978) ont caractérisé chimiquement cette molécule qu'ils nomment roséotoxine B. Il s'agit d'un cyclodepsipeptide de formule brute $C_{30}$ $H_{49}$ $O_7$ $N_5$ (M: 591) qui comprend une molécule des 5 acides aminés suivants: méthyl-3-trans-proline, isoleucine, N-méthylvaline, N-alanine et N-méthylalanine ainsi que l'acide hydroxy -2(+)- penténoïque-4, le tout formant une structure peptidique lactone cyclique.

La structure et la configuration de cette roséotoxine B ont finalement été corrigées et assurées par analyse de RMN et de diffraction aux rayons X; la roséotoxine B (Fig. 5) est donc la cyclo (hydroxy-2(R)-penténoyl-4-méthyl-trans-3-méthyl-L propyl-L- isoleucyl-N-méthyl-L-valyl-N-méthyl-L-

alanyl-$\beta$-alanyl) (Springer & al., 1984). La roséotoxine pure, administrée par voir orale chez des poulets agés de 1 jour, possède une $DL_{50}$ de 12,5mg/kg.

## Les mycosporines

Si *T. roseum* est remarquable par la nature originale de ses terpénoïdes, il se caractérise également par une intense synthèse de mycosporine glutaminol en conditions autorisant la sporulation (Favre-Bonvin & al., 1987). On peut s'interroger sur le fait que cette molécule, si aisément détectable par son spectre UV et présente en quantité non négligeable, *ca.* 1,5 à 2% du poids de matière sèche, ait pu échapper aux nombreux chercheurs intéressés par le chimisme de cette espèce. La raison essentielle réside vraisemblablement dans le fait que l'étude des lipides de *T. roseum*, principal sujet d'analyse chez cette espèce, s'effectue après passage de ces derniers dans une phase organique non miscible à l'eau. De ce fait, les composés parfaitement hydrophiles comme les mycosporines se trouvent totalement éliminés du matériel d'étude. La biogenèse des mycosporines apparait strictement reliée à la sporulation chez *T. roseum* comme cela est d'ailleurs la règle chez les nombeuses espèces où ce type de molécules est présent. Les structures du type mycosporine glutaminol et glutamicol (Fig. 5) ont été élucidées par Pittet & al. (1983) et leur étude biosynthétique réalisée par Favre-Bonvin & al. (1987): la partie cyclique est issue de la voie du shikimate, en amont de ce dernier, vraisemblablement à partir du déhydro-3 quinate.

## Les enzymes

Abondamment analysé pour ses capacités de biosynthèse des terpénoïdes, *T. roseum* a également fait l'objet, notamment de la part de chercheurs russes, d'investigations nombreuses relatives à la libération dans son milieu de culture, d'enzymes intéressant les domaines agro-alimentaire et pharmaceutique.

- **Enzymes à intérêt agro-alimentaire:** cultivé en présence de son, de riz, d'orge et de malt, *T. roseum* excrète des principes à activité cytologique, capables de rompre les parois cellulaires (Kol'tsova, 1980). Les préparations enzymatiques correspondantes, connues sous l'étiquette de cytorosamine (Salmanova & al., 1973a; Zinchenko & Minchuk, 1972) possèdent des activités hemicellulasiques, cellulasiques et cellobiasiques appréciables, de faibles activités pectinasique et peptidasique mais n'ont pas d'activité amylolytique (Salmanova & Zhdanova, 1971a, b; Salmanova & al., 1973b; Enkina & Grishin, 1969a, b).

De telles préparations ont été mises à profit pour améliorer la qualité et le rendement des boissons alcoolisées, l'assimilation des aliments et la décomposition du papier.

Au cours de la saccharification de la vodka l'emploi des cultures de *T. roseum* a permis une hydrolyse efficace des membranes cellulaires conduisant ainsi à un meilleur rendement en alcool (Yarovenko & al., 1973). Lors de la vinification, les extraits cytolytiques de *T. roseum* diminuent le taux de colloïdes des moûts de vin (Zinchenko, 1970), accélèrent leur clarification (Zinchenko &

Balanutse, 1969a, b; Zinchenko & Salmanova, 1968) et augmentent la concentration en polysaccharides des vins jeunes, par rapport aux moûts, en provoquant l'autolyse des cellules de levures (Zinchenko & Minchuk, 1972). De même, l'addition de cytorosamine au cours de la fabrication de la bière améliore la solubilité du malt (Salmanova & al., 1973a), réduit la viscosité du moût (Salmanova & Zhdanova, 1971b) et donne des bières de bonne qualité (Szajer, 1967; Salmanova & al., 1976).

Ces enzymes cytolytiques, notamment celles à activité protéolytique, se révèlent également bénéfiques pour l'alimentation des porcs et de la volaille; cet apport enzymatique provoque une meilleure assimilation des aliments, stimule le stockage de la vitamine A, le métabolisme des protéines et des acides gras ainsi que les réactions de défense de l'organisme (Anderson & Mitrevics, 1972; Solun & al., 1968).

Les préparations cytologiques de *T. roseum*, cultivé sur malt additioné de sciure de bois, contiennent des hemicellulases hydrolysant les hémicelluloses du bouleau et du pin (Galas & Wnuk, 1970) et d'autres enzymes permettant l'hydrolyse totale du papier filtre et partielle du papier cellophane qui devient moins résistant et se déchire facilement (Salmanova & al., 1968). En soumettant des fibres de rayonne, fibres textiles cellulosiques, à l'attaque enzymatique on a pu améliorer leur résistance (Simionescu & al., 1982).

- **Enzymes utilisées en bioconversions:** à l'instar de très nombreux micro-organismes, *T. roseum* s'est révélé lui aussi capable de réaliser des conversions concernant:

* l'hydroxylation des stéroïdes en position 17, 11$\alpha$ et 6$\beta$; on a obtenu ainsi les passages de la cinérone en hydroxy-17 corticostérone et de la déhydro-11 corticostérone en cortisone (Meystre & al., 1954; voir aussi références *in* Capek & al., 1966),

* la transformation des benzyl- et phénoxyméthypénicilline en acide amino-6 pénicillanique (ou 6-APA), sous l'influence d'une pénicilline acylase (Zannini & al., 1968).

* la transformation de l'aphidicoline en acide 18-carboxylique aphidicoline. Ipsen & al. (1982) ont tenté de modifier, par bioconversion, la structure de l'aphidicoline, diterpénoïde à activités antivirale et antitumorale qui agit en inhibant l'ADN polymérase. Mise en présence de *T. roseum*, l'aphidicoline est transformée en un composé acide, le trihydroxy- 3, 16, 17 aphidicolanoate- 18 qui, comme l'aphidicoline, inhibe l'incorporation de l'adénine et de la thymidine mais pas celle de l'uridine.

- **Enzymes à activité fibrinolytique:** en culture submergée *T. roseum* synthétise des exo et endoprotéases exerçant une activité fibrinolytique. En augmentant la teneur en composés carbonés du milieu de culture et en y ajoutant de la gélatine et des peptones on stimule la production, dans le milieu de culture, des composés responsables de cette activité. Après précipitation par l'acétone et purification sur gel de Sephadex G-100, le complexe actif obtenu, nommé tricholysine, entraine la lyse des caillots sanguins *in vitro*. Administrée par voie intraveineuse à des rats la tricholysine manifeste son activité dans les 10 mn qui suivent; après 2h le taux de fibrinogène redevient normal. On peut prolonger l'effet fibrinolytique par des injections répétées de l'enzyme qui ne manifeste aucun effet toxique aux doses

thérapeutiques (Andreenko & al., 1973, 1974). Par fractionnement sur CM Sephadex C-50 à pH6, dans un gradient de NaCl (0-0,5M) il a été possible de séparer des activités fibrinolytiques, estérasiques et caséinolytiques (Stepanova & al., 1976). Des conditions optimales pour une production maximale de tricholysine au bout de 48h de culture ont été déterminées: pH 5,6-6,7; température 25-26°C; aération 5-7g$O_2$ .l/h (Maksimova & al., 1983).

Signalons enfin que le *T. roseum*, comme de très nombreux *Fungi Imperfecti*, possède l'équipement enzymatique complet lui permettant d'effectuer le cycle du mannitol, lequel constitue un moyen très répandu dans le monde fongique pour réguler l'état d'oxydo-réduction des coenzymes $NAD^+/NADP^+$ - NADH /NADPH, comme l'ont montré Hult & al. (1980).

## LISTE DES MÉTABOLITES ISOLÉS DE *TRICHOTHECIUM ROSEUM*

| CLASSES | MÉTABOLITES | RÉFÉRENCES |
|---|---|---|
| **COMPOSÉS VOLATILS** | | |
| (de nature non terpénique) | Méthyl-3 butanol-1 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Octanone-3 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Octène-1 one-3 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Octanol-3 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Octadiène-1,5 one-3 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Octène-1 ol-3 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Méthyl-6 heptène-5 ol-2 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Octadiène-1,5 ol-3 | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Furfural | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Phényl-1 éthanol | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Phénylacétaldéhyde | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Alcool benzylique | Vanhaelen & al. (1978) |
| **POLYACÉTATES** | | |
| | Acide aflatoxinique | Rusan & al. (1983) |
| **LIPIDES** | | |
| *** Acides gras** | | |
| - saturés | Acide myristique ($C_{14}$ : 0) | Sancholle & Montant (1972) |
| | Acide palmitique ($C_{16}$ : 0) | Sancholle & Montant (1972) |
| | Acide stéarique ($C_{18}$ : 0) | Sancholle & Montant (1972) |
| - insaturés | Acide oléique ($C_{18}$ : 1) | Sancholle & Montant (1972) |
| | Acide linoléique ($C_{18}$ : 2) | Sancholle & Montant (1972) |
| | Acide linolénique ($C_{18}$ : 3) | Sancholle & Montant (1972) |
| *** Glycérides** | | |
| - simples | Mono- di- et triglycérides | Sancholle & Montant (1972) |
| - phosphoglycérides | Phosphatidylsérine | Sancholle & Montant (1972) |
| | Phosphatidyléthanolamine | Sancholle & Montant (1972) |
| | Phosphatidylcholine (léthicine) | Sancholle & Montant (1972) |
| | Cardiolipides | Sancholle & Montant (1972) |
| *** Terpénoïdes** | | |
| - monoterpénoïdes | Nérol; acétate du géranyle | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Linalool et son acétate | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Citronellol et son acétate | Vanhaelen & al. (1978) |
| | $\alpha$ et $\beta$ terpinéol | Vanhaelen & al. (1978) |

| | | |
|---|---|---|
| - Sesquiterpénoïdes | Nérodiol | Vanhaelen & al. (1978) |
| | Cyclonérodiol | Nozoe & al. (1970) |
| | Trichodiène | Nozoe & Machida (1970b, 1972) |
| | Trichodiol | Nozoe & Machida (1970a, 1972) |
| | Epoxy-12,13 trichothécène-9 | Machida & Nozoe (1972 a, b) |
| | Dihydroxy-4,8 époxy-12,13 | Machida & Nozoe (1972 a, b) |
| | Trichodermol | Evans & al. (1976 a) |
| | Trichothécolone | Machida & Nozoe (1972 a, b)<br>Fishman & al. (1959)<br>Ghosal & al (1982) |
| | Acétyltrichothécolone | Ghosal & al. (1982) |
| | Trichothécine | Freeman & Morrison (1948, 1949a, b)<br>Fishman & al. (1959) |
| | Crotocine | Gyimesi & Melera (1967) |
| | Toxine T2 | Grunbreg & al. (1983) |
| - Diterpénoïdes | Pimaradiène-8(9),15 | Dockerill & Hanson (1977) |
| | Désoxy-7 rosénonolactone | Whalley & al. (1959)<br>Djerassi & al. (1966) |
| | Rosénonolactone (Roséine I)<br>et Rosololactone (Roséine II) | Freeman & al (1949)<br>Robertson & al. (1949)<br>Harris & al. (1958) |
| | Rosénololactone | Achilladelis & Hanson (1969) |
| | Hydroxy-6$\beta$rosénonolactone | Holzapfel & Steyn (1968)<br>Allison & al. (1968) |
| | Acide isorosénolique | Scott & al. (1964 b) |
| | Hydroxy-11$\beta$ rosénonolactone (Roséine III) | Freeman & al. (1949)<br>Kiriyama & al. (1971) |
| - Triterpénoïdes | Ergostérol | Achilladelis & Hanson (1969) |
| -Tétraterpénoïdes | $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ carotènes, torulène | Maksimova & al. (1973a) |
| MOLÉCULES AZOTÉES | | |
| * **Aminoacides et dérivés** | Arginine, glutamine, tyrosine phénylalanine et tryptophane | Madan & Lata (1981) |
| | Mycosporine glutaminol et Mycosporine glutamicol | Pittet & al. (1983) |
| * **Sidérochromes** | Fusigène et Fusigène B | Laskin & Lechevalier (1973) |
| * **Oligopeptides** | Roséotoxine B | Richard & al. (1969, 1970)<br>Engstrom (1978)<br>Springer & al. (1984) |
| * **Enzymes** | Polygalacturonases | Abdel-Fattah & al. (1977) |
| | Glucanases, pentosanases | Salmanova & Zhdanova (1971a) |
| | Xylanases | Scherbakov (1976) |
| | Cellulases | Salmanova & Zhdanova (1971a)<br>Gracheva & al. (1978)<br>Salmanova & al. (1973 a, b) |
| | Cellobiases | Salmanova & Zhdanova (1971 a, b) |
| | Cytorosémine PKH | Salmanova & al. (1973 a) |
| | Hémicellulases | Galas & Wnuk (1970) |
| | Pectinases | Abdel-Fattah & al. (1977)<br>Hasija & Agarwal (1978) |
| | Protéases | Scherbakov (1976)<br>Salmanova & al. (1973 b) |

| | | |
|---|---|---|
| | Tricholysine (complexe enzymatique) | Andreenko & al (1973) Maksimova & al. (1983) Stepanova & al. (1976) |
| | Pénicilline acylases | Zannini & al. (1968) |
| | Hexokinase | Hult & al. (1980) |
| | Mannitol-1 P déshydrogénase | Hult & al. (1980) |
| | Mannitol-1 phosphatase | Hult & al. (1980) |
| | Mannitol déshydrogénase | Hult & al. (1980) |
| **POLYSACCHARIDES** | | |
| | T poly | George & al. (1981) |

## DISCUSSION

Les propriétés antifongiques de *T. roseum* ont été à l'origine des très nombreux travaux chimiques réalisés sur cette espèce. Entreprise tout d'abord dans l'espoir d'isoler une substance utilisable dans la lutte contre des champignons phytopathogènes - espoir déçu du fait de la haute toxicité de la trichothécine - l'analyse chimique de *T. roseum* s'est révélée très fructueuse au plan fondamental. En effet, par sa remarquable capacité à synthétiser sesqui- et diterpénoïdes, le *T. roseum* a été largement exploité pour déterminer avec précision - stéréochimiquement - les voies de biosynthèse des terpénoïdes, notamment des noyaux trichothécane et rosane.

Par ailleurs, il s'est avéré que la toxicité de cette espèce n'est pas seulement due à la présence d'époxytrichothécènes mais s'explique aussi par la présence de molécules de type roséotoxine B dont la structure cyclique, récemment établie, suggère, du fait de la présence d'acides aminés hydrophobes - hydrophobicité en outre accentuée par substitutions de N-H en $N\text{-}CH_3$ - une similitude avec les molécules de type cyclosporine.

Il peut paraître surprenant que cette espèce - dont les propriétés antifongiques sont manifestes - ait pu être considérée comme une excellente source d'enzymes hydrolytiques, utilisable dans le domaine agro-alimentaire. En effet, il est à craindre que la trichothécine, en grande partie libérée dans le milieu de culture et malgré sa faible hydrophilie, contamine les préparations enzymatiques, également exocellulaires, à moins que ces dernières ne soient soumises à des séries d'extractions par solvants organiques pour éliminer toute trace de toxine.

*T. roseum* apparait être une espèce admirablement dotée biochimiquement pour s'adapter à différents milieux. En effet, elle se révèle capable de synthétiser des hydrolases variées en fonction des substrats rencontrés et, par conséquent, de croître dans des environnements bien différents. De plus, la libération dans son milieu environnant de trichothécine constitue un moyen de défense, performant vis-à-vis d'autres Champignons. Enfin cette espèce, qui se singularise par un processus de conidiogenèse original et une sporulation intense, se protège efficacement du rayonnement solaire non seulement par la présence de caroténoïdes mais surtout par une synthèse abondante de mycosporine glutaminol qui capte les radiations ultraviolettes les plus courtes arrivant à la surface du sol, à savoir dans la zone comprise entre 300-320nm.

Il reste à intégrer l'ensemble de ces connaissances chimiques pour comprendre en profondeur les évènements biochimiques qui sous-tendent la croissance et le développement de cette espèce. Cependant, pour exploiter au mieux nos connaissances, il convient tout d'abord de lever une incertitude majeure concernant l'association entre le *T. roseum* et une bactérie. S'agit-il, oui ou non, d'un exemple nouveau caractérisant une vie associative permanente?

## BIBLIOGRAPHIE

ABDEL-FATTAH A.F., MABROUK S.S. and ISMAIL A.S., 1977 - Production of polygalacturonase, pectin-methylesterase by fungi. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmittel.* 5: 38-41.

ACHILLADELIS B. and HANSON J.R., 1968 - Studies in terpenoid biosynthesis. I. The biosynthesis of metabolites of *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 7: 589-594.

ACHILLADELIS B. and HANSON J.R., 1969 - Minor terpenoids of *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 8: 765-767.

AHMED S.I. and GILES N.H., 1969 - Organisation of enzymes in the common aromatic synthetic pathway: evidence for aggregation in fungi. *J. Bacteriol.* 99: 231-237.

ALLISON A.J., CONNOLLY J.D. and OVERTON K.H., 1968 - 6 $\beta$ - hydroxyrosenonolactone: a new metabolite from *Trichothecium roseum*. *J. Chem. Soc., Ser. C*, 1968: 2122-2125.

ANDERSON P. and MITREVICS E., 1972 - Use of enzyme preparations for increasing the productivity of animals and birds. *Latv. Lauksaimn. Akad. Raksti* 7: 68-74.

ANDREENKO G.V., SILAEV A.B., MAKSIMOVA R.A., POKH L.I., SEREBRYAKOVA T.N. and PODOROL'SKAYA L.V., 1973 - Tricholysin, a fibrinolytic enzyme formed by the imperfect fungus *Trichothecium roseum*. *In*: Sadauskas P.B. & al., *Khim. Proteolit. Ferm. Mater. Vses. Simp.* (Vilsnius, USSR): 61-62.

ANDREENKO G.V., SILAEV A.B., MAKSIMOVA R.A., POKH L.I. and SEREBRYAKOVA T.N., 1974 - Fibrinolytic and thrombolytic effect of proteases from mushroom cultures. *Folia Haematol.* 101: 14-21.

BARATHOVA H., BETINA V. and NEMEC P., 1969 - Morphological changes of fungi induced by antibiotics. *Folia microbiol.* 14: 475-483.

BAWDEN F.C. and FREEMAN G.G., 1952 - The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses produced by *Trichothecium roseum* Link. *J. Gen. Microbiol.* 7: 154-168.

BETINA V. and VANKOVA M., 1977 - Trichothecin, an antibiotic, morphogenic factor, mycotoxin and bitter substance of apples. *Biologia (Bratislava)* 32: 943-949.

BIRCH A.J., RICKARDS R.W., SMITH H., HARRIS A. and WHALLEY J., 1959 - Studies in relation to biosynthesis. XXI. Rosenonolactone and gibberellic acid. *Tetrahedron* 7: 244-251.

BRIAN P.W. and HEMMING H.G., 1947 - Production of antifungal and antibacterial substances by fungi; preliminary examination of 166 strains of *Fungi Imperfecti*. *J. Gen. Microbiol.* 1: 158-167.

BRITT J.J. and ARIGONI D., 1958 - The Biogenesis of the diterpene Rosenonolactone. *Proc. Chem. Soc.* 1958: 224-225.

CAPEK A., HANC O. and TADRA M., 1966 - Biologia et Industria. *In*: Roman W. & Genevoix L., *Microbiol transformations of steroids*, III. La Hague, Publ. Junk.

CARRASCO L., BARBACID M. and VASQUEZ D., 1973 - The trichodermin group of antibiotics, inhibitors of peptid bond formation by eukaryotic ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 312: 368-376.

COLE G.T. and SAMSON R.A., 1979 - Development in *T. roseum*. *In:* Cole G.T. & Samson R.A., *Patterns of development in conidial fungi.* London, Pitman: 89-92.

DEHORTER B., 1985 - Déterminisme et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres. Thèse Doct. Sci. Nat., Lille, n° 628.

DJERASSI C., GREEN B., WHALLEY W.B. and DE GRAZIA C.G., 1966 - The Chemistry of fungi. Part III (Optical Rotatory Dispersion Studies. Part CV). The absolute configuration of Rosenono- and Rosololactone. *J. Chem. Soc., Ser. C.,* 1966: 624-627.

DOCKERILL B. and HANSON J.R., 1977 - Studies in Terpenoid Biosynthesis. Part 19. Formation of Pimara -8(9)- diene by *Trichothecium roseum. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1977: 324-327.

DOCKERILL B., HANSON J.R. and SIVERANS M., 1978 - The biosynthesis of trichothecin from acetate $(1,2\text{-}^{13}C_2)$. *Phytochemistry* 17: 427-430.

DOMSCH K.H., GAMS W. and ANDERSON T.H., 1980 - *Trichothecium* Link ex Gray 1821. *In:* Domsch K.H., Gams W. & Anderson T.H., *Compendium in soil fungi.* New York, London, Academic press: 814-816.

ENGSTROM G.W., DELANCE J.V., RICHARD J.L. and BAETZ A.L., 1975 - Purification and characterization of Roseotoxin B, a toxic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum. J. Agric. Food Chem.* 23: 244-253.

ENGSTROM G.W., 1978 - Amino Acid Sequence of Roseotoxin [redacted]. *J. Agric. Food Chem.* 26: 1403-1406.

ENKINA L.S. and GRISHIN S.A., 1969 a - Intensification of dough fermentation by using a cytolytic enzymes. *Khlebopek. Konditer. Promyshl.* 13: 11-13.

ENKINA L.S. and GRISHIN S.A., 1969b - Preparation of wheat dough using [redacted] cytolytic enzymic preparation. *Khlebopek. Konditer. Promyshl.* 13: 8-11.

EVANS R. and HANSON J.R., 1976 - Studies in terpenoid biosynthesis. Part XIV. Formation of the sesquiterpene trichodiene. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1976: 326-332.

EVANS R., HANSON J.R. and MARTEN T., 1976a - Studies in Trepenoid biosynthesis. Part XVI. Formation of the sesquiterpenoid trichothecin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1976: 1212-1214.

EVANS R., HANSON J.R. and NYFELER R., 1976 b - Studies in terpenoid biosynthesis. Part XVII. Biosynthesis of the sesquiterpenoids cyclonerodiol and cyclonerotriol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1976: 1214-1217.

FAVRE-BONVIN J., BERNILLON J., SALIN N. and ARPIN N., 1987 - Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum. Phytochemistry* 26: 2509-2514.

FISHMAN J., JONES E.R.H., LOWE G. and WHITING M.C., 1959 - Structure and biogenesis of trichothecin. *Proc. Chem. Soc.* 1959: 127-128.

FREEMAN G.G. and MORRISON R.I., 1948 - Trichothecin: an antifungal metabolic product of *T. roseum* Link. *Nature (London)* 162: 30.

FREEMAN G.G. and MORRISON R.I., 1949 a - The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *Biochem. J.* 3: 1-5.

FREEMAN G.G. and MORRISON R.I., 1949 b - Some biological properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *J. Gen. Microbiol.* 3: 60-68.

FREEMAN G.G., MORRISON R.I. and MICHAEL S.E., 1949 - Metabolic products of *Trichothecium roseum* Link. *Biochem. J.* 45: 191-199.

FREEMAN G.G., 1955 - Further Biological Properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link, and its derivatives. *J. Gen. Microbiol.* 12: 213-221.

FREEMAN G.G., GILL J.E. and WARING W.S., 1959 - The structure of Trichothecin and its hydrolysis products. *J. Chem. Soc.* 1959: 1105-1132.

GALAS E. and WNUK K., 1970 - Hemicellulases of *Trichothecium roseum*. *Zesz. Nauk Politech. Lodz. Chem. Spozyw.* 17: 72-82.

GEORGE C.X., GUPTA B.M., KHURANA S.M., PAUL S.M. and NAGAICH B.B., 1981 - Antiviral activity in plants of ■ mycoviral double-stranded RNA from *Trichothecium roseum*. *Acta Virol.* 25: 408-414.

GHOSAL S., CHAKRABARTI D.K., SRIVASTAVA A.K. and SRIVASTAVA R.S., 1982 - Toxic 12,13-epoxytrichothecenes from anise fruits infected with *Trichothecium roseum*. *J. Agric. Food Chem.* 30: 106-109.

GLATZ E.T., CSANYI E. and GYIMESI J., 1966 - Supplementary data on crotocin - an antifungal antibiotic. *Nature (London)* 212: 617-618.

GOETSCH L., THOMASSET N. and VILA J. - Antitumoral activity of trichothecolone (à paraître).

GRACHEVA I.M., VAGANOVA M.B. and SALOVAROVA V.P., 1978 - Cellulases formation by the soil yeast *Trichosporon* and microscopic fungi. *Mikrobiologija* 47: 226-229.

GRUNBREG N., RUSAN M. and VITALARU C., 1983 - Contributions of the isolation and identification of some mycotoxines from *Trichothecium roseum* Link. II. The isolation and identification of $T_2$ toxine from *Trichothecium roseum* Link. *Bol. Soc. Brot.*, Ser. 2, 56: 33-37.

GYIMESI J. and MELERA A., 1967 - On the structure of crotocin, an antifungal antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 1967 (n° 17): 1665-1673.

HARRIS A., ROBERTSON A. and WHALLEY W.B., 1958 - The Chemistry of Fungi. Part XXXI. The structure of rosenonolactone. *J. Chem. Soc.* 1958: 1799-1807; Part XXXII. Rosololactone, ■ metabolite of *Trichothecium roseum*. *Ibid.* 1807-1813.

HASIJA S.K. and AGARWAL H.C., 1978 - Production of pectic enzymes by *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ex Fries. *Biochem. Physiol. Pfl.* 172: 125-132.

HOLZAPFEL C.W. and STEYN P.S., 1968 - The isolation and structure of a new diterpene lactone from *Trichothecium roseum*. *Tetrahedron* 24: 3321-3325.

HOLZAPFEL C.W., BIRCH A.J. and RICKARDS R.W., 1969 - The oxidation of desoxyrosenonolactone by *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 8: 1009-1012.

HULT K., VEIDE A. and GATENBECK S., 1980 - The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch. Microbiol.* 128: 253-255.

INGOLD C.T., 1956 - The conidial apparatus of *Trichothecium roseum*. *Trans. Brit. Mycol Soc.* 39: 460-464.

IPSEN J., FUSKA J., FOSKOVA A. and ROSAZZA J.P., 1982 - Microbial transformations of natural antitumor agents. 21- Conversions of Aphidicolin. *J. Org. Chem.* 47: 3278- 3282.

JONES E.R.H. and LOWE G., 1960 - The biogenesis of Trichothecin. *J. Chem. Soc.* 1960: 3959-3961.

KENDRICK W.B. and COLE G.T., 1969 - Conidium ontogeny in Hyphomycetes. *Trichothecium roseum* and its meristem arthrospores. *Canad. J. Bot.* 47: 345-350.

KIRIYAMA N., YAMAMOTO Y. and TSUDA Y., 1971 - Metabolite of *Trichothecium roseum*. Structure of roseine III. *Yakag. Zass.* 91: 1078-1087.

KOLTSOVA I.F., 1980 - Effect of culture medium ingredients on the biosynthesis of cytolytic enzymes by the *Trichothecium roseum* fungus under production condition. *Mikrobiol. Zurn.* 92: 197-200.

LASKIN A.I. and LECHEVALIER H.A., 1973 - *Handbook of microbiology. Microbiol Products.* 3. Cleveland, CRC press.

LERMITERIE M.H., 1973 - Recherche sur un cas d'association entre le *Trichothecium roseum* et une bactérie et sur quelques aspects nouveaux dans la morphologie de cet Adelomycète. Thèse doct. spèc. 3ème cycle, Toulouse.

MACHIDA Y. and NOZOE S., 1972 a - Biosynthesis of trichothecin and related compounds. *Tetrahedron* 28: 5113-5117.

MACHIDA Y. and NOZOE S., 1972 b - Biosynthesis of trichothecin and related compounds. *Tetrahedron Lett.* 1972 (n° 19): 1969-1972.

MADAN M. and LATA K., 1981 - Amino acid composition of mycelium of two fruit rot fungi. *Indian J. Mycol. Pl. Pathol.* 11: 130-131.

MAKSIMOVA R.A., PENNER L.F. and MINAEVA T.A., 1973 a - Formation of carotenoid pigments by the imperfect fungus *Trichothecium roseum*. *Biol. Nauki Nauch. Dokl. Vyssh. Shk., SSSR* 16: 92-96.

MAKSIMOVA R.A., SILAEV A.B., GRUSHINA V.A. and DEMIDOVA N.I., 1973 b - Effect of trichothecin on imperfect *Trichothecium roseum* producing the antifungal antibiotic trichothecin. *Antibiotiki (Moscow)* 15: 230-233.

MAKSIMOVA R.A. and GRUSHINA V.A., 1974 - Inhibitory effect of trichothecin on germination conidia of strains of *Trichothecium roseum*, a source of the antibiotic. *Mikol. Fitopatol* 8: 431-434.

MAKSIMOVA R.A., POKH L.I. and SILAEV A.B., 1975 - Inactivation of trichothecin by proteolytic enzymes of *Trichothecium roseum*. *Antibiotiki (Moscow)* 20: 1081-1085.

MAKSIMOVA R.A., PAL'MOVA N.P., SHARKOVA T.S., KHURATOVA B.G. and LEIKINA M.I., 1982 - Effect of trichothecin against mycelia of fungi. *Abh. Bayer Akad. Wiss., Math. Naturwiss. Abt.* 1982: 309-313.

MAKSIMOVA R.A., SHARKOVA T.S., KHURATOVA B.G., PAL'MOVA N.P., MINAEVA T.A., ANDREENKO G.V., SEREBRYAKOVA T.N., MURASHOVA N.S. and KOZLOVA M.A., 1983 - Biosynthesis of tricholysin, a complex of fibrinolytic enzymes, in submerged culture of the saprophytic fungus *Trichothecium roseum*. *Gematol. Transfuziol.* 28: 33-37.

MEYSTRE C., VISHER E. and WETTSTEIN A., 1954 - Mikrobiologishe Hydroxylierung von Steroiden (in der 17α - und 21- Stellung). *Helv. Chim. Acta* 37: 1548-1553.

MONTANT C., 1952 - De la sporogenèse de *Trichothecium roseum* (Link). *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 87: 89-102.

MONTANT C. et ORCIVAL J., 1960 - Étude des variations du rapport source carbonée/source azotée au cours de la croissance de *Trichothecium roseum* (Pers.) Link. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 250: 4444-4446.

MONTANT C. et SANCHOLLE M., 1969 - Évolution des lipides du *Trichothecium roseum* au cours des premiers stades de la croissance en fonction des variations de la

source nutritive carbonée. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, Sér. D, 269: 886-889.

MORGAN A.G. and MACMILLAN A., 1954 - The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Exp. Bot.* 5: 232-252.

NICOT J. et LEDUC A., 1957 - Mise en évidence d'un mucilage dans la paroi des spores du *Trichothecium roseum* Link ex Fr. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad Sci.* 244: 1403-1405.

NOZOE S. and MACHIDA Y., 1970 a - Isolation and structure of trichodiol, a new sesquiterpenoid from *Trichothecium roseum*. *Tetrahedron Lett.* 1970 (n° 14): 1177-1179.

NOZOE S. and MACHIDA Y., 1970 b - Structure of trichodiene. *Tetrahedron Lett.* 1970 (n° 14): 2671-2674.

NOZOE S. GOI M. and MORISAKI N., 1970 - Structure of cyclonerodiol. *Tetrahedron Lett.* 1970 (n° 15): 1293-1296; Synthesis and stereochemistry of cyclonerodiol. *Ibid.* 1971 (n° 40): 3701-3702.

NOZOE S. and MACHIDA Y., 1972 - The structures of trichodiol and trichodiene. *Tetrahedron* 28: 5105-5111.

PAL'MOVA N.P. and MAKSIMOVA R.A., 1976 - Morphogenetic action of trichothecin on *Trichothecium roseum*. *Mikrobiologija* 45: 1023-1027.

PITTET J.L., BOUILLANT M.L., BERNILLON J., ARPIN N. and FAVRE-BONVIN J., 1983 - The presence of reduced-glutamine mycosporines, new molecules, in several Deuteromycetes. *Tetrahedron Lett.* 1983 (n° 24): 65-68.

RICHARD J.L., ENGSTROM G.N., PIER A.C. and TIFFANY L.H., 1969 - Toxigenicity of *Trichothecium roseum* Link: isolation and partial characterization of a toxic metabolite. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 39: 231-240.

RICHARD J.L., PIER A.C. and TIFFANY L.H., 1970 - Biological effects of toxic products from *Trichothecium roseum* Link. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 40: 161-170.

ROBERTSON A., SMITHIES W.R. and TITTENSOR E., 1949 - The chemistry of fungi. Part VI. Rosenonolactone from *Trichothecium roseum* Link. *J. Chem. Soc.* 1949: 879-883.

RUSAN M., GRUNBREG N. and VITALARU C., 1983 - Contributions to the isolation and identification of some mycotoxins from *Trichothecium roseum* Link. I. The separation and identification of some furocumarins from *Trichothecium roseum* Link cultures. *Bol. Soc. Brot.*, Ser. 2, 56: 23-32.

SALMANOVA L.S., ZHDANOVA L.A. and VESELOV A.I., 1968 - Effect of *Trichothecium roseum* enzymes on cellophane and filter paper. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 4: 666-669.

SALMANOVA L.S. and ZHDANOVA L.A., 1971 a - Action of cytolytic enzymes from the fungus *Trichothecium roseum* on nonmalt barley. *Ferment. Spirt. Promyshl.* 37: 15-18.

SALMANOVA L.S. and ZHDANOVA L.A., 1971 b - Separation of enzymes of the cytolytic enzymic complex of the fungus *Trichothecium roseum* by gel filtration on Sephadex columns. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 7: 161-165.

SALMANOVA L.S., SHEPTUN L.S. and ZHDANOVA L.A., 1973 a - Use of the enzymic preparation cytorosemin PKH for treating hard-to-dissolve malt. *Ferment. Spirt. Promyshl.* 1973: 28-30.

SALMANOVA L.S., ZHDANOVA L.A. and SOBOLEVSKAYA T.N., 1973 b - Production of a refined enzyme preparation from a cytolytic culture of the fungus *Trichothecium roseum*. *Ferment. Mikroorgan.* 1973: 134-140.

SALMANOVA L.S., VESELOV I.Y., BALASHOV V.E., SHKOP Y.F. and KOLPAKCHI A.P., 1976 - Preparation of a concentrated brewer's wort for the product of beer. Brevet, URSS n° 561, 736. *(Chem. Abstr.* 1976, 85, p. 469, n° 92199).

SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S. and VAN OORSCHOT C.A.N., 1981 - *Introduction to food-Borne Fungi.* Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

SANCHOLLE M. et MONTANT C., 1972 - Analyse des constituants de la fraction lipidique isolée du mycélium du *Trichothecium roseum* au cours des premiers stades de croissance. *Canad. J. Bot.* 50: 247-251.

SANCHOLLE M., MONTANT C., LE BARS J. and ABADIE M., 1977 - Association of the mould *Trichothecium roseum* (Pers.) Link. Fourth FEMS Symposium, Vienna. Abstracts: B 26.

SCHERBAKOV M.A., 1976 - Biosynthesis of cellulase, proteinase and xylanase by microorganisms. *Izv. Akad. Nauk Moldavsk. SSR, Ser. Biol. Khim Nauk* 1976: 33-36.

SCOTT A.I., SUTHERLAND S.A., YOUNG D.W., GUGLIEMETTI L.G., ARIGONI D. and SIM G.A., 1964 a - The Structure and Absolute Configuration of Rosololactone and Related Diterpenoid Lactones. *Proc. Chem. Soc.* 1964: 19-21.

SCOTT A.I., YOUNG D.W., HUTCHINSON S.A. and BHACCA N.S., 1964 b - Isorosenolic acid, a new diterpenoid constituent of *Trichothecium roseum. Tetrahedron Lett.* 1964 (n° 15): 849-854.

SIMIONESCU C.I., POPA V.I., RUSAN V., STOLERIU A., RUSAN M. and DRAGOMIR B., 1982 - Complex conversion of biomasse. II. Microbiological degradation of cellulose materials. *Revista Padur. Indust. Lemnului Celuloza Hirtie, Ser. Celuloza Hirtie,* 31: 169-172.

SIMOLA K.L. and LONNROTH K., 1979 - The effect of some protein and non protein amino acids on the growth of *Cladosporium herbarum* and *Trichothecium roseum. Physiol. Pl.* 46: 381-387.

SOLUN A.S., MAGDON G.A., POKATILOVA G.A., 1968 - The physiological role and efficiency of enzyme additives in poultry ratios. *Vestn. Sel'skokhoz. Nauki* 13: 69-74.

SORENSON W.G., SNELLER M.R. and LARSH H.W., 1975 - Qualitative and quantitative assay of trichothecin: a mycotoxin produced by *Trichothecium roseum. Appl. Microbiol.* 29: 653-657.

SPRINGER J.P., COLE R.J., DORNER J.W., COX R.H., RICHARD J.L., BARNES C.L. and VAN DER HELM D., 1984 - Structure and conformation of roseotoxin B. *J. Amer. Chem. Soc.* 106: 2388- 2392.

STEPANOVA T., MAKSIMOVA R.A., YULIKOVA E.P., SILAEV A.B., ANDREENKO G.V. and SEREBRYAKOVA T.N., 1976 - Fractionation of tricholysin, a preparation of fibrinolytic enzymes formed by *Trichothecium roseum* Lk. ex Fr. on carboxymethyl Sephadex G-50. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 12: 407-410.

SZAJER C., 1967 - Effect of enzymic extracts from *Trichothecium roseum* strains on the content of extract and protein fractions in beer during storage. *Ann. Univ. Mariae Curiae-Skodowska,* Sect. E, 1967: 253-261.

TAMM C. and TORI M., 1984 - Trichothecenes. *In* Betina V., *Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification.* Amsterdam, Elsevier, 525 p.

TURNER W.B. and ALDRIDGE D.C., 1983 - *Fungal metabolites II.* London, Academic Press, 631 p.

UENO Y., 1983 - Trichothecenes. Chemical, biological and Toxicological aspects, *In: Developments in Food Science,* 4. Amsterdam, Elsevier, 313 p.

VANHAELEN M., VANHAELEN-FASTRE R. and GEERAERTS J., 1978 - Volatile constituents of *Trichothecium roseum. Sabouraudia* 16: 141-150.

VEZINA C., SINGH K. and SEHGAL S.N., 1965 - Sporulation of filamentous fungi in submerged culture. *Mycologia* 57: 722-736.

WHALLEY W.B., GREEN B., ARIGONI D., BRITT J.J. and DJERASSI C., 1959 - The absolute configuration of rosenonolactone and related diterpenoids. *J. Amer. Chem. Soc.* 81: 5520-5521.

YAROVENKO V.L., USTINNIKOV B.A., SALMANOVA L.S., PYKHOVA S.V. and LAZAREVA A.N., 1973 - Continuous production of alcohol from a starch raw material. Brevet, URSS n° 276, 888. *(Chem. Abstr.* 1974, 81, p. 201, n° 2413).

ZANNINI E., PIACENZA E. and FABRI G., 1968 - Enzymic product of 6-amino-penicillanic acid. Brevet, Afrique du Sud n° 68 00295.

ZELENEVA R.N., MAKSIMOVA R.A. and SILAEV A.B., 1979 - Lipids from the fungus *Trichothecium roseum* Lk. ex Fr. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 15: 389-393.

ZINCHENKO V.I. and SALMANOVA L.S., 1968 - Preparation of wine materials. Brevet, URSS n° 212, 946 *(Chem. Abstr.* 1968, 69, p. 1685, n° 18043).

ZINCHENKO V.I. and BALANUTSE A.P., 1969 ■ - Clarification of fraction III must. *Vinodel. Vinograd. SSSR* 29: 17-21.

ZINCHENKO V.I. and BALANUTSE A.P., 1969 b - Clarification of first-fraction must. *Sadov. Vinograd. Vinodel. Moldav.* 24: 35-39.

ZINCHENKO V.I., 1970 - Effect of the cytolytic enzymic preparation on must colloids. *Sadov. Vinograd. Vinodel. Moldav.* 25: 27-30.

ZINCHENKO V.I. and MINCHUK E.L., 1972 - Effect of grape must water-soluble polysaccharides on wine quality. *Sadov. Vinograd. Vinodel. Moldav.* 27: 24-27.